

李耀国, 孙 彤, 武文丽, 等. 马氏珠母贝 *GAPDH* 基因克隆及其在去甲基化受精卵中的表达分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(10): 38–42.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.010

马氏珠母贝 *GAPDH* 基因克隆及其在去甲基化受精卵中的表达分析

李耀国, 孙 彤, 武文丽, 陈永志, 蒋丹尼

(海南热带海洋学院生命科学与生态学院, 海南三亚 572022)

摘要:利用 RACE(rapid amplification of cDNA ends)技术,克隆了马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因的全长 cDNA 序列。*GAPDH* 基因 cDNA 全长为 1 174 bp(GenBank 登录号: KX129947.1),其开放阅读框长度为 1 014 bp,编码 337 个氨基酸,蛋白质分子量为 36.04 ku,理论等电点 7.66,无信号肽。蛋白质亚细胞定位显示 GAPDH 蛋白分布在细胞质中的可能性最大(69.6%)。该蛋白具有 1 个甘油醛-3-磷酸脱氢酶 NAD 结构域以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶 C 末端结构域。系统进化分析表明, GAPDH 在亲缘关系上与同为软体动物门的厚壳玉黍螺最近,与其动物学分类地位一致。荧光定量 PCR 分析显示,经去甲基化试剂 5-氮杂胞苷处理后的受精卵 *GAPDH* 基因表达水平显著上升($P < 0.05$)。

关键词:马氏珠母贝; *GAPDH*; cDNA 克隆; 去甲基化; 表达

中图分类号: Q786; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0038-05

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),是参与糖酵解等能量代谢反应中的关键酶,还具有修复 DNA、调节组蛋白、促进细胞凋亡等一系列功能,是一种参与多种亚细胞水平活动的多功能蛋白质^[1]。GAPDH 广泛存在于众多生物体中,在细胞中含量占总蛋白质的 10%~20%;种属间序列高度保守,因在同种细胞或不同组织中蛋白质表达量相对恒定而常作为管家基因^[2]。其分子一般为 4 个相同亚基构成的四聚体,每个亚基含催化结构域和辅酶结合结构域^[3]。水产动物中已有 *GAPDH* 基因的 cDNA 全长序列克隆及相关研究。如半滑舌鳎 *GAPDH* 基因的开放阅读框全长序列为 1 002 bp,编码 333 个氨基酸的多肽链^[4]。外因刺激可以改变 *GAPDH* 的表达水平,雌性食蚊鱼暴露在不同浓度双氯芬酸钠后肝脏 *GAPDH* 的表达量出现显著变化^[5]。

DNA 链上存在一种甲基化修饰,被视为基因表达的“沉默标记”,它可通过甲基基团的空间位阻效应或促使抑制蛋白与甲基化 DNA 相结合而抑制基因表达^[6]。去甲基化试剂 5-氮杂胞苷能整合到 DNA 链中,抑制甲基化转移酶的活性使基因或基因组去甲基化,进而调节基因的表达^[7-8]。

马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)是中国南部沿海广泛分布的一种珍珠贝。目前,尚未见马氏珠母贝 *GAPDH* 基因全长 cDNA 序列的相关报道。本研究对马氏珠母贝 *GAPDH* 基因的全长 cDNA 进行了克隆及生物信息学分析,并探索了去甲基化试剂对受精卵中 *GAPDH* 基因表达水平的影响,以为后续 *GAPDH* 的功能研究提供基础。

收稿日期:2016-12-04

基金项目:海南省自然科学基金(编号:20164166);海南热带海洋学院学科带头人和博士科研启动基金(编号:RHDXB201620)。

作者简介:李耀国(1986—),男,湖南湘乡人,博士,讲师,主要从事水产动物分子育种与资源保护研究。E-mail: yaoguo1jkl@163.com。

1 材料与方法

1.1 样品采集

试验用马氏珠母贝采集自中国科学院大亚湾海洋生物综合实验站(深圳),于实验基地海水池中暂养 1 周。取健康马氏珠母贝外套膜组织,迅速转移至 -80℃ 液氮罐中保存待用。此外,设立 3 组马氏珠母贝雌、雄亲本单对配对的人工授精试验。分别将每组单对配对亲本产生的精子和卵细胞混合形成受精卵,并将每组分成为两大部分,对照组采用灭菌海水处理 10 min,试验组用 10^{-5} mol/L 5-氮杂胞苷溶液处理 10 min。处理后分别采集各组受精卵样品于液氮保存待用。

1.2 核酸提取及 cDNA 模板合成

样品总 RNA 的提取按照广州美基公司的核酸提取试剂盒说明书操作,提取后的 RNA 稀释于超纯水中,利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 分光光度计 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值分析核酸的完整性和测定核酸浓度。RACE 试验所用 cDNA 模板合成按 SMARTer™ RACE(rapid amplification of cDNA ends) cDNA Amplification Kit(Clontech, USA)说明书进行。荧光定量 PCR 检测所用 cDNA 模板按照 ReverTra Ace-first strand cDNA synthesis kit(TOYOBO, Japan)试剂盒说明书进行合成。

1.3 *GAPDH* cDNA 全长序列克隆

基于转录组测序所得马氏珠母贝对应 *GAPDH* 基因的 Unigene 序列(603 bp),应用 Primer Premier 5.0 软件设计 RACE PCR 所需正、反向引物,引物由华大基因广州分公司合成。引物分别为 5' 端 RACE 外引物 GARA5-1 和 5' 端内引物 GARA5-2; 3' 端 RACE 外引物 GARA3-1 和 3' 端内引物 GARA3-2。RACE PCR 外扩增的反应体系为 25 μL,包含: 12.5 μL Premix Ex Taq(TaKaRa, 大连), 1 μL cDNA 模板, 1 μL 10 pmol/L 基因 5' 端或 3' 端外引物, 1 μL 10 pmol/L 的 UPM mix 引物(由 UPM long 和 UPM short 引物混合配制而

成),加 ddH₂O 9.5 μL。扩增程序为:94 ℃ 5 min;5 个循环的 94 ℃ 45 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min;15 个循环的 94 ℃ 45 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min;15 个循环的 94 ℃ 45 s,56 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min;最后在 72 ℃ 下延伸 5 min。将第一轮 RACE 外扩增 PCR 产物稀释 30 倍作为第二轮内扩增 PCR 反应的模板,内扩增 PCR 体积为 25 μL:12.5 μL Premix Ex Taq,1 μL 稀释的产物模板,1 μL 对应的 5' 端或 3' 端 10 pmol/L 内引物,1 μL 10 pmol/L NUP 引物,加 ddH₂O 9.5 μL。反应程序为:94 ℃ 5 min;35 个循环的 94 ℃ 45 s,56 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min;72 ℃ 下延伸 5 min。取 5 μL PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后,切取单一条带,胶纯化,送华大基因广州分公司转菌落测序。

1.4 序列分析

通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中 Blast 程序进行 2 个序列比对分析,将获得的 5' 端或 3' 端 cDNA 序列以及转录组 GAPDH 对应 Unigene 序列进行拼接得到 GAPDH 基因全长 cDNA 序列。GAPDH 基因的开放阅读框预测由 NCBI 中在线软件 ORF Finder 分析完成。利用 ProtParam 软件分析该基因的蛋白质分子量、理论等电点等信息。SignalP - 4.1 server <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测 GAPDH 蛋白的信号肽序列。在线软件 TMHMM Server 2.0 预

测跨膜结构,PSORT Prediction 软件预测亚细胞定位点。蛋白质的三级结构由 Swiss - Model 在线服务器 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行预测。GAPDH 蛋白质的氨基酸残基序列同源性比对由 ClustalW1.83 软件完成,利用 MEGA 5.0 软件共同完成系统进化树的构建(采用邻接法,并设置 Bootstrap 值为 1 000)。

1.5 荧光定量分析

基于获得的 GAPDH cDNA 全长序列设计荧光定量 PCR 引物 GAPDHF 和 GAPDHR 进行基因表达量检测。对马氏珠母贝 3 个单对配对亲本产生的对照组和试验组受精卵样品中 GAPDH 的表达量进行检测,选用的内参基因为马氏珠母贝 18S (GenBank 登录号:AY028625.1,引物为 18S F 和 18S R)。荧光定量 PCR 反应在 Roche LightCycler480 仪器中进行。反应体系如下:5 μL 2 × SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa),1 μL 模板 cDNA,荧光定量引物各 0.4 μL (10 μmol/L),加 3.2 μL 去离子水使总体积为 10 μL。反应条件为:95 ℃ 1 min;45 个循环的 95 ℃ 5 s,54 ℃ 15 s,72 ℃ 60 s。PCR 产物特异性根据溶解曲线作出判断,基因的相对表达量通过 C_t 方法计算。利用 SPSS 19.0 软件卡方检验比较组间 GAPDH 基因表达水平差异,显著性水平设置为 *P* < 0.05,本试验中所有引物序列见表 1。

表 1 GAPDH 基因 cDNA 克隆及荧光定量表达引物

引物名称	用途	引物序列 (5'→3')
UPM long	RACE PCR	CTAATACGACTCACTATAGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM short	RACE PCR	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	RACE PCR	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
GARA5 - 1	RACE PCR	TCGTTGATTATCTTGGCGAGTGG
GARA5 - 2	RACE PCR	ACATAGGAGCATCAGCAGACGGT
GARA3 - 1	RACE PCR	AGATGGTGCCGAGTATGTGGTAG
GARA3 - 2	RACE PCR	GCACCGTCTGCTGATGCTCTAT
GAPDHF	荧光定量	GATGGTGCCGAGTATGT
GAPDHR	荧光定量	TGATTATCTTGGCGAGTG
18S F	荧光定量	ACACCGCCGCTCGCTACTAC
18S R	荧光定量	CGCCCTTCTTCTCGGCACAC

2 结果与分析

2.1 GAPDH 基因 cDNA 全长序列的获得

基于马氏珠母贝转录组测序所得 GAPDH Unigene 序列进行 RACE PCR。扩增得到了长度为 281 bp 的 5' 端和 1 088 bp 的 3' 端产物(图 1)。拼接 5' 末端序列、3' 末端序列和 Unigene 序列得到了全长为 1 174 bp 的 GAPDH 基因 cDNA 序列。该 cDNA 序列的 ORF 长度为 1 014 bp,编码 337 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA。序列的 5' 端存在 38 bp 的非翻译区,3' 端存在 122 bp 的非翻译区(图 2)。

2.2 GAPDH 基因编码蛋白质特征分析

对 GAPDH 基因编码的蛋白质序列进行生物信息学分析,结果显示其所编码蛋白质的原子总数为 5 068,蛋白质分子量为 36.04 ku,理论等电点为 7.66,不稳定系数值为 23.89,属于稳定蛋白。该蛋白序列经预测不具有信号肽,无跨膜结构域。GAPDH 蛋白质的亚细胞定位分析显示该蛋白分布在细胞质中的可能性最大(69.6%)。该蛋白具有 1 个甘油醛 -

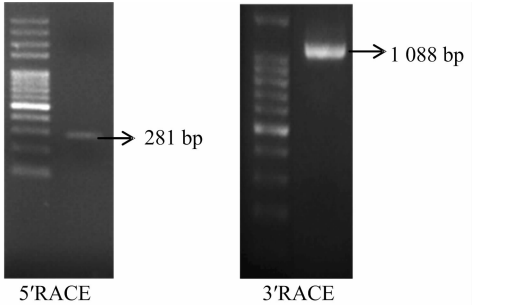


图1 马氏珠母贝 RACE 扩增 PCR 电泳条带

3 - 磷酸脱氢酶 NAD 结合域以及甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 C 末端结构域。用 SWISS - MODEL 在线分析对马氏珠母贝 GAPDH 编码蛋白的三级结构进行了建模预测,结果如图 3 所示(模型为马来丝虫的 GAPDH 蛋白,SMTL id:4k9d.1)。

2.3 GAPDH 基因序列比对与系统树分析

用 ClustalW1.83 软件将马氏珠母贝 GAPDH 氨基酸序列与章鱼 (*Octopus bimaculoides*, XP_014786157.1)、厚壳玉黍螺

1 ATCAGCAGGAAGATTGACTTGACATAACACAGCACCAATGACCAAGCCAAAAG
M T K P K
55 TAGGAATCAATGGTTTGGCCGATTGGCCGACTTGTGTGAGAGCTGCTTTGG
V G I N G F G R I G R L V L R A A L
109 CGTCAGACAAAGATGGTTGTCCGTCAACGATCCATTATGACCTGCCAT
A S D K V E V V S V N D P F M D L P
163 CATGGTGTACATGCTGAAGTACGACTCTACACATGGTAGATATAAGGAGAAG
Y M V Y M L K Y D S T H G R Y K G E
217 AAAGGATGACGGGAGAAAGTTGATGAGTGGGAAATCTATCACCGTGCTATG
V K D D G K K L I V G G K S I T V H
271 AGAGAGAGATCTGCAGCAATCCCCGGGTGCAGATGGTGCCGAGTATGTGG
A E R D P A A I P W G A D G A E Y V
325 AGAATCTACAGGTGATTACACAACCGAAAAAGCATCTGCACATTTGAAAG
V E S T G V F T T T E K A S A H L K
379 GGGAGCAAAAGATGGTTTCTTGCACCGTCTGCTGATGCTCCTATGTTTG
G G A K K V V I S A P S A D A P M F
433 AATGGGGGTGAATGAGGACAGCTACAAAAAGATCACAATGTTGTAAGCAATG
V M G V N E D S Y K K D H N V V S N
487 CCTCTTGACCAACAACTGTTAGCTCCACTCGCCAAGATAATCAACGACAATT
A S C T T N C L A P L A K C I I N D N
541 TTGGCATTGAGGAAGGTTTGATGACCACTGTCCACGCCATTACAGCTACCCAGA
F G I E E G L M T T V H A I T A T Q
595 AACAGTGGACGGCCCAAGCAGAAGGACTGGCGGTGGAGCGCACTGCGGCCT
K T V D G P S Q K D W R G G R T A A
649 CTAACATCATACCATCTCCTCACTGGAGCTGCCAAAGCCGTAGGCAAGTTATAC
S N I I P S S T G A K A D V G K V I
703 CAGAGTAAATGGGAAGTTGACAGGAATGGCCTTCGCTGTACCTGTATCTGATG
P E L N G K L T G M A F R V P V S D
757 TTTCGGTAGTAGATCTGCTGTCTTAAGAAACAGCAAAATTATGATGCTA
V S V V D L T C R L K K A A N Y D A
811 AAAGAAAGCTGTCAAAGATGCAAGTGAAGTAAATGAAGGAATTATGGAAT
I K K A V K D A S E G K M K G I M E
865 ACACAGAAAGTATGTTGTTCTTACAGACTTATCGGAAGACATCTAGCAGTG
Y T E D D V V S S D F I G S T S S
919 TTTGATGCAAAAGCCGAATAGCTTTGAATGATAATTTGTCAAGCTGGTTT
V F D A K A G I A L N D N F V K L V
973 CCTGGTATGACAATGAGTTGGGTACAGTAACCGAGTAGTGGACCTCATCCAGC
S W Y D N E F G Y S N R V V D L I Q
1027 ACATGTACGCTACTGACAACAAGTAAAGCGTGGGCACAATTATCAACATCCAAA
H M S A T D N K
1081 AGATGGATTGTTTTCCTACTAACGTTCAATTTCTGTATTGTTGCTGCTT
1135 GGATTGAAAGTGCTACGATAACAAAAA

起始密码子及终止密码子以黑色方框表示

图2 GAPDH 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列



图3 GAPDH 蛋白质三级结构预测

(*Littorina littorea*, AJA37895. 1)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*, BAF43305. 1)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, NP_001267044. 1)、孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*, XP_008429670. 1)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, XP_005455495. 1)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*, XP_018538252. 1)、丝虫 (*Loa loa*, EJD75047. 1)、布氏鼠耳蝠 (*Myotis brandtii*, XP_005873775. 1)、橙腹草原田鼠 (*Microtus ochrogaster*, XP_005365298. 1)、灰地鼠 (*Cricetulus griseus*, NP_001231783. 1)、密西西比短吻鳄 (*Alligator mississippiensis*, XP_006258426. 1)、中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*, NP_001273856. 1)、绿海龟 (*Chelonia mydas*, ALU11325. 1)、东部乌梢蛇 (*Thamnophis sirtalis*, XP_013923068. 1)、新疆北鲵 (*Ranodon sibiricus*, AMA21735. 1)、眼斑雀鲋 (*Lepisosteus oculatus*, XP_006642411. 1) 和小孢根霉 (*Rhizopus microsporus*, CEG72784. 1) 的 GAPDH 氨基酸序列进行多重比较,发现共有 177 个氨基酸残基位点为完全保守位点(图 4)。对上述物种的 GAPDH 进行系统发育树的构建,发现马氏珠母贝 GAPDH 蛋白首先与软体动物

门的厚壳玉黍螺 (*Littorina littorea*, AJA37895. 1) 进行聚类,然后与同是软体动物门的章鱼 (*Octopus bimaculoides*, XP_014786157. 1) 进行聚类,进化树亲缘关系与动物分类学地位一致(图 5)。

2.4 去甲基化试剂处理受精卵中 GAPDH 表达检测
荧光定量 PCR 检测显示,经去甲基化试剂 5-氮杂胞苷溶液处理后,GAPDH 基因在马氏珠母贝受精卵中的表达水平上升,其表达量显著高于对照组(灭菌海水处理)受精卵样品中的表达量($P < 0.05$)(图 6)。

3 结论与讨论

本研究通过 RACE 技术克隆获得了马氏珠母贝 GAPDH 基因 cDNA 全长序列(GenBank 登录号:KX129947. 1)。该基因全长 1 174 bp,其开放阅读框长度为 1 014 bp,编码 337 个氨基酸,蛋白质分子量为 36. 04 ku,该蛋白具甘油醛-3-磷酸脱氢酶 NAD 结构域和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 C 末端结构域。在糖酵解过程中,这 2 个结构域可结合 3-磷酸甘油醛和 NAD⁺,催化 3-磷酸甘油醛转变为 1,3-二磷酸甘油酸,并以 NAD⁺ 为受氢体生成 NADH^[3]。GAPDH 蛋白的氨基酸序列在物种间保守性高,该研究比对物种中共有 177 个氨基酸残基位点为完全保守位点。马氏珠母贝 GAPDH 蛋白与同属软体动物门的厚壳玉黍螺和章鱼的亲缘关系相近,这与它们均为软体动物的分类学地位一致。

定量检测基因表达时,目的基因的表达量需与参考基因表达量进行标准化处理,GAPDH 基因常被用作参考基因。如 GAPDH 基因在家蝇的不同发育时期及组织和不同饲养条件下表达稳定,可作为基因定量表达检测的内参基因^[9]。理想的内参基因应在各类型细胞、不同组织及不同处理条件下均表达量恒定,而研究发现大多常用的内参基因表达并不稳定,会影响到实时荧光定量 PCR 实验的准确性^[10-11]。GAPDH 基因在严重败血症病人血液中的表达量较正常人中的表达量显著升高^[12]。利用 3 种软件分析蓝点马鲛鱼候选内参基因 EF-1 α 、18S rRNA 和 GAPDH 在不同组织中的表达稳定性,结果显示 GAPDH 表达量是最不稳定的^[13]。应用实时荧光定量 PCR 检测了马氏珠母贝 GAPDH、 β -肌动蛋白和 18S rRNA 共 3 个基因在不同组织、性腺发育时期、胚胎发育时期的表达水平。结果显示, β -肌动蛋白表达量最稳定,18S 核糖体 RNA 在性腺发育阶段表达最稳定,而 GAPDH 基因在 3 个试验组中均显示为稳定性最差^[14]。

基因核苷酸序列变异及其上的表观遗传修饰均可引起基因表达量的变化。笔者前期研究发现马氏珠母贝外套膜基因组 DNA 甲基化水平与 galectin 基因的表达水平呈负相关,而 galectin 启动子区甲基化水平与基因表达水平呈显著正相关,DNA 甲基化可能对 galectin 基因的表达具调控作用^[15]。本研究中发现马氏珠母贝受精卵经去甲基化试剂 5-氮杂胞苷处理后,GAPDH 基因表达水平较对照组显著上升($P < 0.05$)。据此可推测,马氏珠母贝 GAPDH 基因表达升高可能是去甲基化修饰所致,而其不适合作为内参基因的可能原因是不同条件下基因甲基化修饰变化所引起的基因表达水平变化。

本研究获得了马氏珠母贝 GAPDH 基因的全长 cDNA 序

<i>C. griseus</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSGKVEVVAINDPFFIDINXYM.YMF.CYDSHG	52
<i>M. ochrogaster</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSAKVDIVAINDPFFIDINXYM.YMF.CYDSHG	52
<i>M. brandii</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTNSGKVDIVAINDPFFIDINXYM.YMF.CYDSHG	52
<i>A. mississippiensis</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSSGKVEVVAINDPFFIDINXYM.YMF.CYDSHG	52
<i>C. mydas</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTISGKIQVAINDPFFIDINXYM.YMF.CYDSHG	52
<i>P. sinensis</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTCDVQVAINDPFFIDINXYM.YMF.CYDSHG	52
<i>T. sirtalis</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTQSGKQVAINDPFFIDISYMYM.YMF.CYDSHG	52
<i>L. oculatus</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTISGKVEVVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	52
<i>R. sibiricus</i>MTKIGNGFGRIGRLVIRAAFTVLSKQVQVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	52
<i>L. calcarifer</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSHSKVEVVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	52
<i>O. niloticus</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSHSKVEVVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	52
<i>P. reticulata</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSKKVEVVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	52
<i>T. rubripes</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSKKVEVVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	52
<i>M. anguillicaudatus</i>MVKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSKKVEVVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	52
<i>L. loa</i>MSKPFHNGNGFGRIGRLVIRAAVEKTDIDVVAINDPFFIDINXYM.YMF.CYDSHG	54
<i>O. bimaculoides</i>	MEEKNFCLVCCASSLSSHDRKSKMAFVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSLKDD.INVVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	74
<i>L. littorea</i>MPTKVGNGFGRIGRLVIRAAFTLNKQDVTVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	53
<i>R. microspor</i>MVLKVGNGFGRIGRLVIRAAFTSLERDNUQVVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	53
<i>P. fucata</i>MTKPKVGNNGFGRIGRLVIRAAFTSLERDNUQVVAINDPFFIDIBYMYM.YMF.CYDSHG	54
<i>C. griseus</i>	KFKGTVKAENGKLVING...KATITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>M. ochrogaster</i>	KFKGTVKAENGKLVING...KATITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>M. brandii</i>	KFKGTVKAENGKLVING...KATITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>A. mississippiensis</i>	RFHGTVKAENGKLVING...HAITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>C. mydas</i>	RFHGTVKAENGKLVING...NQITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>P. sinensis</i>	RFHGTVKAENGKLVING...QAITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>T. sirtalis</i>	RFSSVKAENGKLVING...HAITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>L. oculatus</i>	RFHGTVKAENGKLVING...KAITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>R. sibiricus</i>	RFHGTVKAENGKLVING...HAITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>L. calcarifer</i>	RYKGEVKAENGKLVING...HKITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>O. niloticus</i>	RYKGEVKAENGKLVING...HKITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>P. reticulata</i>	RYKGEVKAENGKLVING...HKITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>T. rubripes</i>	RYKGEVKAENGKLVING...HAITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>M. anguillicaudatus</i>	RYKGEVKAENGKLVING...HAITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	123
<i>L. loa</i>	RFKGNVSAEGGKLVINGKRTTHHISVHNSKDPADHGVGAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	129
<i>O. bimaculoides</i>	QFFACVSKGEGKLVING...TLITVTSKEDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	145
<i>L. littorea</i>	QYKTEIVKNGKLVING...QAITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	124
<i>R. microspor</i>	RFKGTVEHKGKLVING...KEITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	124
<i>P. fucata</i>	RYKGEVKDDGKLVING...KATITVFCERDPAKIRWGD.GAEVVESTGVFTTIEKASHLKGGAKRVVISAPS	125
<i>C. griseus</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>M. ochrogaster</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>M. brandii</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>A. mississippiensis</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>C. mydas</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>P. sinensis</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>T. sirtalis</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>L. oculatus</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>R. sibiricus</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>L. calcarifer</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>O. niloticus</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>P. reticulata</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>T. rubripes</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>M. anguillicaudatus</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>L. loa</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	197
<i>O. bimaculoides</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	204
<i>L. littorea</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	219
<i>R. microspor</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	198
<i>P. fucata</i>	ADAPMEVGVNKHEDYNS...EKVSNASCTTNCPLAPLKVIEDNFGIVEGLMTVHVAITATQKVDGPGSKRWRRG	198
<i>C. griseus</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>M. ochrogaster</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>M. brandii</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>A. mississippiensis</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>C. mydas</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>P. sinensis</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>T. sirtalis</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>L. oculatus</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>R. sibiricus</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>L. calcarifer</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>O. niloticus</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>P. reticulata</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>T. rubripes</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>M. anguillicaudatus</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>L. loa</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	272
<i>O. bimaculoides</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	279
<i>L. littorea</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	294
<i>R. microspor</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	273
<i>P. fucata</i>	REAAENIIPSTGAAKAVGVKVF...LNGKLITGMAFR.FTENVSVDV.TRLRKPAPKYDILIKVVAHASEGHLKCIL	274
<i>C. griseus</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>M. ochrogaster</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>M. brandii</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>A. mississippiensis</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>C. mydas</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>P. sinensis</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>T. sirtalis</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>L. oculatus</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>R. sibiricus</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>L. calcarifer</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>O. niloticus</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>P. reticulata</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>T. rubripes</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>M. anguillicaudatus</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>L. loa</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>O. bimaculoides</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>L. littorea</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>R. microspor</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333
<i>P. fucata</i>	EYTEDVVSDDNSISHSSTFDAGAGTALNDNFVKLISWYDNEFCYS.RVVLIMVMAASKE...	333

图4 不同物种的 GAPDH 氨基酸序列比对结果

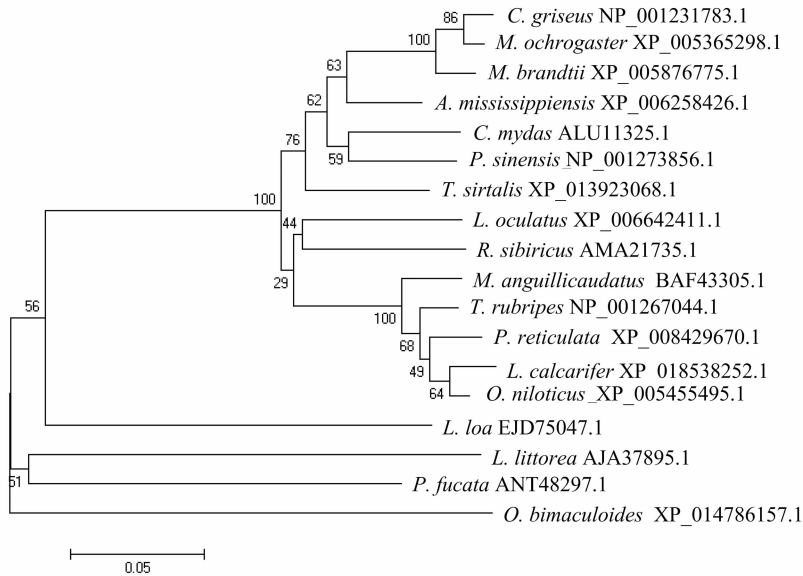


图5 GAPDH 系统发育树构建

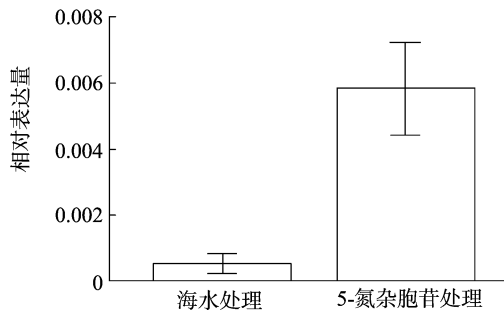


图6 马氏珠母贝受精卵经 5-氮杂胞苷处理后 GAPDH 表达水平变化

列,并利用去甲基化试剂(5-氮杂胞苷)处理受精卵,结果发现 *GAPDH* 基因表达量显著升高。本研究结果为今后 *GAPDH* 基因的功能研究及表达调控机制分析提供了基础及思路。

参考文献:

- [1] 禹淞文,李清明. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶的应用进展[J]. 农产品加工·学刊,2014(5):51-53.
- [2] 郝立宏,马坚伟,邵淑娟. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)作为内参的质疑以及在肿瘤中的表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2011,20(5):496-498.
- [3] 付国良,黄晓红. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶功能的研究进展[J]. 生物物理学报,2013,29(3):181-191.
- [4] 陈蓉,饶颖竹,梁静真,等. 半滑舌鳎 *GAPDH* 基因开放读码框的克隆及序列分析[J]. 广东农业科学,2012,39(19):126-130.
- [5] 欧瑞康,武小燕,库培佳,等. 食蚊鱼(*Gambusia affinis*) *cat*, *gapdh* 和 *gst* 基因的克隆及其在生态毒理学中的应用[J]. 生态毒理学报,2015,10(3):83-92.
- [6] Jones P A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond [J]. Nature Reviews Genetics, 2012, 13 (7): 484-492.
- [7] Griffin P T, Niederhuth C E, Schmitz R J. A comparative analysis of 5-azacytidine- and zebularine-induced DNA demethylation [J]. Genes, Genomes, Genetics, 2016, 6(9): 2773-2780.
- [8] Chutkan N, Sangani R, Zhou H, et al. DNA demethylation regulates anabolic and catabolic gene expression in intervertebral disc cells [J]. Global Spine Journal, 2014, 4 (Suppl 1): 13.
- [9] 胡红元,任春丽,尚小丽,等. 家蝇 *GAPDH* 基因的克隆、表达及作为内参的可靠性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11 (3): 250-256.
- [10] 张莉恒,王师,常亚青,等. 夏眠期仿刺参肠组织实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016(7): 35-43.
- [11] Dekkers B J, Willems L, Bassel G W, et al. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds [J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(1): 28-37.
- [12] Sarveswaran J, Orsi N M, Cummings M, et al. *GAPDH*: is it a reliable housekeeper gene to use in sepsis research? [J]. Critical Care, 2012, 16 (Suppl 3): 1.
- [13] 张家玲,薛良义,史钧信. 蓝点马鲛鱼内参基因的克隆及表达稳定性评价 [J]. 生物学杂志, 2016, 33(3): 20-23.
- [14] 王琦,何毛贤. 合浦珠母贝实时定量 PCR 内参基因的稳定性比较 [J]. 南方水产科学, 2013, 9(6): 33-40.
- [15] Li Y, Huang X, Guan Y, et al. DNA methylation is associated with expression level changes of galectin gene in mantle wound healing process of pearl oyster, *Pinctada fucata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 912-918.